

TNF レセプター1 型および2 型遺伝子多型と 広汎性侵襲性歯周炎の関連性について

島田 靖子*¹ 田井 秀明*¹ 遠藤 基広*¹
小林 哲夫*^{1,2} 山崎 和久*¹ 吉江 弘正*¹

*¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 摂食環境制御学講座
歯周診断・再建学分野

*²新潟大学歯学部附属病院 総合診療部

(2003 年 7 月 5 日受理)

Analysis of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and 2 Gene Polymorphisms in Japanese Patients with Generalized Aggressive Periodontitis

Yasuko Shimada*¹, Hideaki Tai*¹, Motohiro Endo*¹,
Tetsuo Kobayashi*^{1,2}, Kazuhisa Yamazaki*¹ and Hiromasa Yoshie*¹

*¹Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Course for Oral Life Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

*²General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Dental Hospital

Accepted for publication 5 July 2003

Periodontitis is considered to be a polygenic disease. Susceptibility to aggressive periodontitis (AgP), formerly known as early-onset periodontitis, might be associated with genetic polymorphisms. Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1 and 2 are cell surface receptors for TNF- α . Recent studies have suggested that TNFRs may modulate TNF- α -mediated inflammatory responses in periodontal disease. The aim of the present study was to evaluate whether TNFR 1 and TNFR 2 gene polymorphisms are associated with AgP in Japanese patients.

Forty-five generalized AgP (G-AgP) patients and 100 age-matched healthy Japanese subjects were selected according to established clinical criteria. Single nucleotide polymorphisms at positions -383 (A/C) and +36 (A/G) in the TNFR 1 gene, at positions +587 (T/G) and +694 (G/A) in the TNFR 2 gene, and the variable number of tandem repeats (VNTR) promoter polymorphism in the TNFR 2 gene were detected using polymerase chain reactions, restriction fragment length polymorphisms, single-strand conformation polymorphisms, and direct sequencing methods. Statistically significant differences between the AgP and healthy groups were determined using chi-square and Fisher exact tests, equivalent results were assessed using the equivalence-delta test and further adjusted using the Mantel-Haenszel method.

The frequency of the -383 C allele was significantly lower in the G-AgP patients group than in the healthy group ($p=0.04$). On the other hand, equivalent allele frequencies between the two groups were found at three positions (+587 (T/G), +694 (G/A) and VNTR) in the TNFR 2 gene. After adjusting for a confounding factor, the +587 (T/G) and VNTR allele frequencies of the two groups were found to be significantly equivalent ($p<0.01$).

These findings suggest that the TNFR 1 (-383 A/C) gene polymorphism might be associated with G-AgP, whereas the TNFR 2 +587 (T/G) and VNTR gene polymorphisms are not likely to result in a susceptibility to G-AgP. *J Jpn Soc Periodontol*, 45 : 267~278, 2003.

Key words : TNF receptor, gene polymorphism, aggressive periodontitis

要旨：歯周炎は多因子疾患の一つと考えられ、なかでも侵襲性（早期発症型）歯周炎の疾患感受性には遺伝子多型の関与が示唆されている。一方で、歯周炎局所でTNF α のシグナル伝達・調節機能を担うTNFレセプター（TNFR）の機能についても着目されている。そこで今回、日本人におけるTNFRの遺伝子多型と侵襲性歯周炎との関連性について検討した。

インフォームドコンセントを得た日本人広汎性侵襲性歯周炎患者45名および年齢を適合させた健常者100名を対象とした。5カ所の遺伝子多型はそれぞれTNFR 2（VNTR）はPCR法、TNFR 1（-383；A/C）、（+36；A/G）、TNFR 2（+587；T/G）はPCR-RFLP法、TNFR 2（+694；G/A）はPCR-SSCP法にて検出した。統計学的解析はカイ2乗検定、フィッシャーの直接確率法、同等性の Δ 検定とさらにMantel-Haenszel法による補正を行った。

その結果、TNFR 1（-383）ではCアレルの頻度が患者群に有意に低いことを認めた。さらに患者群と健常者群では、3カ所のTNFR 2アレル頻度に同等性が認められ、交絡因子で補正後もTNFR 2（+587）および（VNTR）には同等性が有意に認められた。

以上の結果より、広汎性侵襲性歯周炎にはTNFR 1（-383）遺伝子多型が関連する一方で、TNFR 2（+587）、（VNTR）には関連性が乏しい可能性が示唆された。

索引用語：TNFレセプター、遺伝子多型、侵襲性歯周炎

緒 言

歯周炎は口腔内細菌による感染症であり、細菌の病原因子と生体の防御機能との相互作用の結果として表現される。ありふれた病気（common diseases）の一つである歯周炎は多因子疾患と考えられ、その発症や進行は、複数の遺伝的因子の相加的効果と環境因子が疾患感受性の閾値を超えるために生じるとされる。この2つの因子が疾患の発症や進行に寄与する割合は、同じ歯周疾患のなかでもさまざまであると考えられる¹⁾。なかでも侵襲性（早期発症型）歯周炎は、若年者における発症と急速な歯周組織の破壊、歯槽骨の吸収を特徴とし、遺伝的因子のより強い関与が示唆されている²⁻⁵⁾。近年、ヒトゲノム研究を背景とした多因子疾患における疾患感受性遺伝子の検索が盛んに行われている。歯周炎においてもその病態生理上重要な既知の遺伝子から候補遺伝子を設定し、その変異（多型）と疾患の関連を解析する「候補遺伝子アプローチ」法による探索が活発化してきている⁶⁾。

腫瘍壊死因子- α （Tumor Necrosis Factor- α ，TNF- α ）はインターロイキン-1（Interleukin（IL）-1）、インターロイキン-6（IL-6）と並ぶ炎症性サイトカインのひとつであり、歯周炎局所においては、単球やリンパ球などの免疫担当細胞のみならず、上皮細胞や線維芽細胞などの歯周組織を構築する細胞からも産生される。TNF- α はIL-1 β と共に、歯周炎患者の歯肉溝滲出液中や歯肉組織中に存在し、過剰な免疫応答の結果、歯周組織の破壊や骨吸収をもたらすことが知られている^{7,8)}。

TNF- α には、TNFレセプター-1型（TNFR 1）

と2型（TNFR 2）の2つの受容体が存在し、その発現はマクロファージ、リンパ球、好中球、線維芽細胞と多岐の細胞にわたる。その機能は、主にTNFR 1がTNFのシグナル伝達を担い、TNFR 2はこのTNFR 1とTNFのシグナル伝達の制御を行っていると考えられている⁹⁾。また、可溶性TNFレセプターは、細胞膜貫通型のTNFレセプターの細胞膜外の部分が切断酵素により解離することで産生され、TNF- α と結合して細胞膜上のTNFレセプターへの結合を抑制することが知られている⁹⁾。

Tervahartiala et al.¹⁰⁾は、歯周炎において慢性歯周炎組織にTNF- α とTNFR 1は共に発現しているが、TNFR 2の発現は少ないということを免疫組織学的手法を用いて証明した。また、Graves et al.¹¹⁻¹³⁾はサルの実験的歯周炎モデルを用いた一連の研究の中で、IL-1レセプターアンタゴニストと可溶性TNFR 2が破骨細胞の活性を低下させ、歯槽骨の吸収と結合組織破壊を抑制することを示した。さらにOhe et al.¹⁴⁾は、ヒト歯肉線維芽細胞をIL-1 β とTNF- α で刺激すると、可溶性TNFR 1の産生量は変化しないが、可溶性TNFR 2の産生量は増加することを報告している。これらのことより、歯周炎においても主にTNFR 1がTNF- α のシグナル伝達に作用し、TNFR 2はTNF- α による炎症反応の制御に大きく関与していることが示唆される。

我々はこれまでに、日本人におけるTNF- α 、IL-1、IL-10といったサイトカインやFc γ レセプターを候補遺伝子として、遺伝子多型と広汎性侵襲性（早期発症型）および慢性（成人性）歯周炎との関連性について検討を行ってきた¹⁵⁻¹⁷⁾。Tai et al.¹⁵⁾は、IL-1遺伝子ファミリーの中でもIL-1レセプターアンタゴニ

スト遺伝子多型の広汎性侵襲性（早期発症型）歯周炎への関与を明らかにしてきた。また Endo et al.¹⁶⁾ は、TNF- α プロモーター領域に存在する5カ所（-1031, -863, -857, -308, -238）の一塩基多型（Single nucleotide polymorphism, SNP）を解析したところ、（-857）遺伝子多型を有するハプロタイプ頻度は、統計学的には有意でないものの、広汎性侵襲性歯周炎患者で低い傾向にあることから、TNF- α （-857）遺伝子多型が、広汎性侵襲性歯周炎においてむしろ疾患抵抗性を示すマーカーとなる可能性を報告した。こうした結果より、歯周炎の病態形成に関わる TNF- α のシグナル伝達経路に強く作用し、炎症反応の制御にも深く関わる TNF レセプターを新たな候補遺伝子として検索する必要性が示唆された。

一方、最近では糖尿病や虚血性心疾患をはじめとする全身疾患と歯周炎との関連性が着目されている。歯周炎は歯周組織に限局した局所的炎症性結合組織性疾患であるが、全身的な結合組織性疾患としてはリウマチ性疾患があり、両者の病態に類似性があるとされている。代表的なリウマチ性疾患として全身性エリテマトーデス（SLE）や関節リウマチ（RA）があげられるが、なかでも RA は病変部に炎症性細胞浸潤が見られ、炎症性サイトカインや IL-8、形質転換増殖因子- β 、プロスタグランジン E₂、メタロプロテアーゼなどの産生が軒並み亢進している点で、歯周炎と病態が類似している。それ故、RA の新しい治療法を模索する上で、歯周炎はそのモデルになることが提唱されている¹⁸⁾。実際に欧米では、可溶性 TNFR 2 は、RA の TNF- α に起因する炎症反応を抑制する抗炎症性サイトカイン薬として臨床応用されつつある¹⁹⁾。こうしたリウマチ性疾患における感受性遺伝子の探索において、TNF- α ならびに TNFR 2 遺伝子は、ゲノムワイド連鎖解析法やケースコントロール関連解析法のいずれの方法によっても関連性が認められており、特に日本人の患者群において関連性の報告があるのは興味深い²⁰⁻²²⁾。このように、歯周炎と病態の類似性をもつ疾患の感受性遺伝子を歯周炎における候補遺伝子として検索することは有用であり²³⁾、TNFR 2 遺伝子もこの候補遺伝子の一つと考えられる。

ヒト TNFR 1 遺伝子は第12染色体短腕13²⁴⁾に、またヒト TNFR 2 遺伝子は第1染色体短腕36²⁵⁾に位置する。これらの遺伝子には、図1、2にそれぞれ示す通り、TNFR 1 遺伝子に3カ所^{26,27)}、TNFR 2 遺伝子には12カ所の遺伝子多型がこれまでに報告されている^{21,25,28,29)}。検索する遺伝子多型を選択する一般的な基準は、遺伝子発現に何らかの影響を及ぼすと考えられる機能的多型であること、疾患感受性に関わる

形質のマッピングのための遺伝子マーカーとして有用であることの2点である。今回我々は、TNFR 1 遺伝子の2カ所の SNP と、TNFR 2 遺伝子の2カ所の SNP および1カ所の VNTR (Variable number of tandem repeats) 多型を選択した。TNFR 1 遺伝子プロモーター領域に存在する-383:A→Cの SNP²⁶⁾は、転写活性因子結合部位である-385から-207の領域内に位置し³⁰⁾、日本人では1型糖尿病との関連性が報告されている。また最近では、プロモーター活性に影響を及ぼすことが報告されていることから³¹⁾、機能的意義のある多型としてこれを選択した。TNFR 1 遺伝子第1エクソン領域に存在する+36:A→Gの SNP²⁷⁾はアミノ酸の変異を伴わないサイレント多型であり、この SNP 自体は機能的多型ではない。しかし、プロモーター領域の近傍に位置すること、日本人において報告がまだないことから、遺伝子マーカーのひとつとしてこれを選択した。さらに、近年この SNP と連鎖不平衡にあるプロモーター領域の SNP の存在も報告されている³²⁾。一方、TNFR 2 遺伝子に存在する12カ所の遺伝子多型のうち、日本人においては-1413:A→C、-1120:G→C、+511-512:GC→CG、+1176:G→Aの4カ所の遺伝子多型は存在しないことが報告されている²¹⁾。また(+168)の SNP は、(+587)の SNP とほぼ完全な連鎖不平衡にあることが報告されている²⁸⁾。これらの報告をもとに、3カ所の機能的意義のある多型を選択した。すなわち、TNFR 2 遺伝子第6エクソン領域+587:T→Gの SNP²¹⁾、+694:G→Aの SNP²⁸⁾は、それぞれメチオニンからアルギニン、グリシンからリシンのそれぞれアミノ酸変異を伴っており、ともに細胞膜上の TNF レセプターが酵素によって切断され可溶性となる部位の近傍に位置している。(+587) 遺伝子多型は SLE や RA、(+694) 遺伝子多型は SLE での解析が行われており、特に日本人や白人において(+587) 遺伝子多型は疾患との関連性が報告されている^{21,33,34)}。TNFR 2 遺伝子プロモーター領域に存在する、15塩基の繰り返し数の違いによる VNTR 多型も転写活性因子結合部位である-363から-322の領域に存在しており²⁹⁾、SLE での解析がすでに行われているが³⁶⁾、日本人による報告はまだない。

このように TNFR 遺伝子多型は歯周炎の疾患感受性遺伝子の候補として検索するのに大変興味深いのが、疾患との関連性はまだ報告されていない。そこで今回我々は、TNFR 1 および TNFR 2 遺伝子多型の日本人における頻度を検索し、広汎性侵襲性歯周炎との関連性について検討を行った。

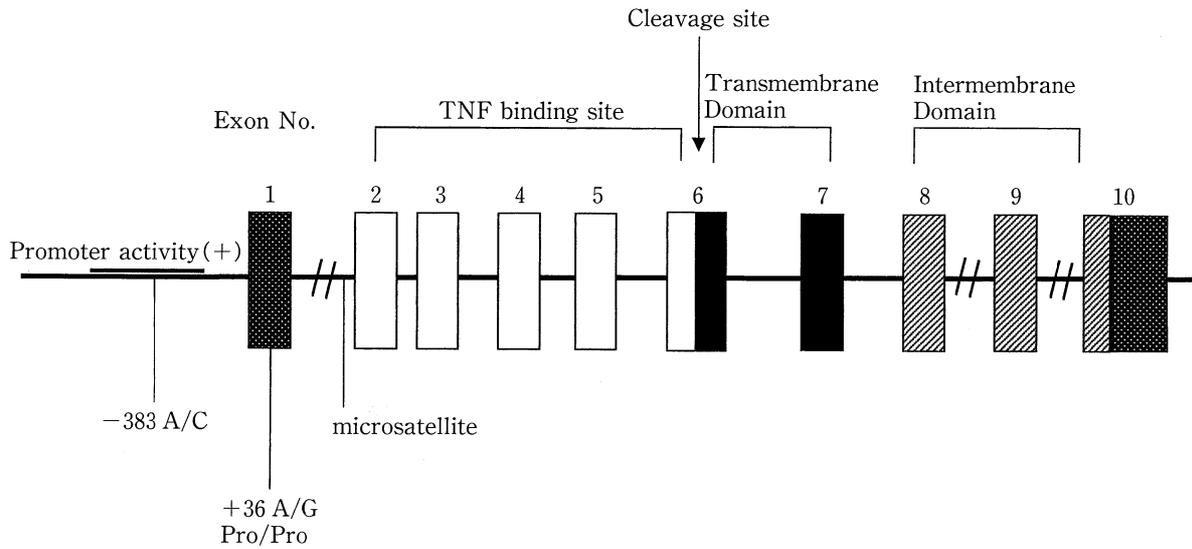


図1 TNFレセプター1型の遺伝子多型

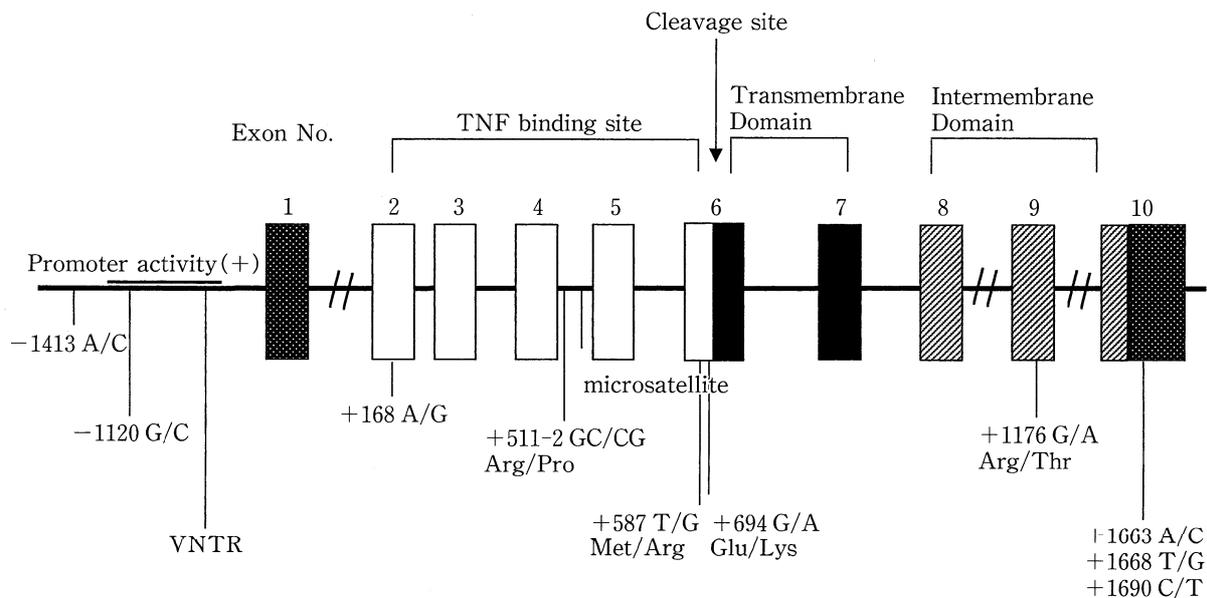


図2 TNFレセプター2型の遺伝子多型

材料および方法

1. 被験者

新潟大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診し、後述の基準により広汎性侵襲性歯周炎と診断された45名(男性15名,女性30名,平均年齢 32.6 ± 0.6 歳)と100名の健常者ボランティア(男性46名,女性54名,平均年齢 27.1 ± 0.3 歳)を被験者とした。全ての被験者は日本人で全身疾患および喫煙歴のない者とし、十分なインフォームドコンセントが得られた後、

同意書に署名・捺印していただいた。

なお本研究は新潟大学歯学部倫理委員会の承認済みである。

2. 臨床検査項目

患者群には、初診時に数名の歯科医師により、以下の項目について口腔内診査およびレントゲン診査を行った。

- 1) 現在歯数および欠損歯数
- 2) プロービングポケット深さ (PPD)
- 3) クリニカルアタッチメントレベル (CAL)
- 4) O'Learyのプラークコントロールレコード (O')

表 1 各 TNF レセプター遺伝子多型タイピング時の PCR 条件

遺伝子多型	プライマー	アニーリング温度	Ref.
TNFR 1 -383	sense 5'-CCA GAG AAT TTG ACT CCC AGA CT-3'	60°C	26)
	anti-sense 5'-CAA CAG CGG GAC AGG AAG AGC-3'		
+36	sense 5'-GAG CCC AAA TGG GGG AGT GAG AGG-3'	62°C	27)
	anti-sense 5'-ACC AGG CCC GGG CAG GAG AG-3'		
TNFR 2 +587	sense 5'-ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT-3'	60°C	21)
	anti-sense 5'-TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT-3'		
+694	sense 5'-CAG CCA GTG TCC ACA CGA T-3'	56°C	28)
	anti-sense 5'-GAC AGG CAG ACA GAA GGA GT-3'		
VNTR	sense 5'-CAG GGA AGC CTG TGG GAG-3'	59°C	29)
	anti-sense 5'-GGC CTT GGA CAC GCC TCC-3'		

Leary's PCR)

5) プロービング時の出血 (BOP)

6) 骨吸収度 (BL)

3. 診断基準

1999年アメリカ歯周病学会の新分類²⁾によれば、侵襲性歯周炎の臨床診断基準は1) 歯周炎を除き臨床的健康状態である、2) 急速な付着の喪失と歯槽骨破壊、3) 歯周炎に関して家族性が認められる、の3項目である。今回我々はこの分類と Diehl et al.³⁷⁾の報告に基づき、広汎性侵襲性歯周炎の診断基準を以下のように定めた。

1) 5 mm以上のCALが8歯以上に見られ、かつそのうち3歯は切歯と第一大臼歯でないもの。

2) 初診時年齢が40歳以下の者。

広汎性侵襲性歯周炎患者群は、臨床的には現在歯数 26.9 ± 0.4 (平均値 \pm 標準誤差) 歯、欠損歯数 2.3 ± 0.4 歯、平均 PPD 4.3 ± 0.1 mm、平均 CAL 5.0 ± 0.2 mm、O'Leary's PCR $51.7 \pm 3.6\%$ 、BOP $42.3 \pm 4.8\%$ 、平均 BL $43.4 \pm 2.1\%$ であった。今回の対象となった患者について初診時に問診を行ったところ、全ての患者に明らかな家族性の発症は見出せなかった。

一方、健常者群は広汎性侵襲性歯周炎患者群と年齢がほぼ一致し、PPDおよびCALが3mmを越える部位を全く持たない者を対象とした。

4. DNA 採取

被験者より採取した末梢血 5 ml より、DNA 採取キット (DNA Extractor WB Kit, 和光純薬工業, 大阪) を用いて DNA を抽出し、70 ng/ μ l に調整した。

5. 遺伝子多型のタイピング

TNFR 1 (-383), (+36), TNFR 2 (+587) は PCR-RFLP 法 (polymerase chain reaction-

restriction fragment length polymorphism), TNFR 2 (+694) は PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) 法, TNFR 2 (VNTR) は PCR 法にて遺伝子型を決定した。なお、いずれの遺伝子多型も数サンプルをダイレクトシーエンス法を併用し確認を行った。

1) PCR-RFLP 法

35-70 ng の被験者 DNA を、10 \times 反応バッファー、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、0.75 μ M プライマー、1.25 U Taq polymerase (AmpliTaq Gold™, Applied Biosystems, U.S.A.) を最終容量 25 μ l に調整した反応液を用いて PCR 反応を行った。95°C で 10 分間インキュベートした後、95°C の熱変性、アニーリング、72°C の伸張反応を各 1 分ずつ 35 サイクル行った。個々のプライマー、アニーリング温度は、表 1 に示す通りである。

PCR 産物は TNFR 1 (-383) は 10 units の制限酵素 Bgl II ((株)宝酒造, 京都)²⁶⁾、TNFR 1 (+36) は 10 units の制限酵素 MspA 1 I (New England BioLabs, UK)²⁷⁾、TNFR 2 (+587) は 5 units の制限酵素 Hsp 92 II (Promega Corporation, U.S.A.) と 37°C で 16 時間反応させた後、3% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色でバンドを可視化した。それぞれ TNFR 1 (-383) A アレルは 144+110 bp, C アレルは 254 bp, TNFR 1 (+36) A アレルは 183 bp, G アレルは 108+75 bp, TNFR 2 (+587) T アレルは 133 bp+109 bp, G アレルは 242 bp のバンドにより遺伝子型を決定した。

2) PCR-SSCP 法

上記の条件で得られた PCR 産物 2 μ l と 18 μ l の denaturing solution (formamide with 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) を混和し、95°C で 5 分間熱処理を行った。直ちに氷上にて急冷

した後、16 μ l を5%のグリセロールを含む10%ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動は0.5×TBEバッファーを用い、電流15 mA/gel、泳動バッファーを25°Cに保って行った。泳動装置はミニゲル恒温電気泳動装置 (AE-6370; ATTO 株式会社, 東京) を使用した。Single-strand DNA fragments は銀染色キット (第一化学, 東京) を用いて可視化し、バンドの位置により TNFR 2 (+694) 遺伝子型を決定した。

3) PCR 法

TNFR 2 (VNTR) 遺伝子型は PCR 法を上記の条件で行った後2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色でバンドを可視化した。15 bp の繰り返し数が1回のアレル1は208 bp、繰り返し数が2回のアレル2は223 bp のバンドにより遺伝子型を決定した。

4) ダイレクトシーケンス法

上記の条件で得られたそれぞれの PCR 産物は、PCR 法に用いたものと同じプライマーで BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit と ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, U.S.A.) を用いてダイレクトシーケンスを行い、確認を行った。

6. 統計解析

各遺伝子多型の広汎性侵襲性歯周炎との関連性を検討するために、患者群と健常者群での遺伝子型頻度とアレル頻度をそれぞれ2×3表、2×2表のカイ2乗検定を行った (Stat View J-4.5 application program, SAS Institute Inc., U.S.A.)。TNFR 1 (-383) 遺伝子型には期待度数5以下の値が認められたので、フィッシャーの直接確率法による検定を行った。また、同等性を検定するために、アレル頻度に関して同等性の Δ 検定を許容範囲0.1 (10%) として行った。さらに、それぞれ Mantel-Haenszel の方法により交絡因子として性別の補正を行った³⁸⁾。全ての解析は $p < 0.05$ をもって統計学的有意とみなした。

結 果

1. TNF レセプター遺伝子多型の健常者における頻度

健常者における TNFR 1 (-383), (+36), TNFR 2 (+587), (+694), (VNTR) それぞれの遺伝子型の頻度は、表2に示す通りである。それぞれの頻度を、ハーディ・ワインベルグ平衡が成立するかどうか統計学的に検定したところ、すべての遺伝子型においてハーディ・ワインベルグ平衡とのずれがな

いことが分かった (それぞれ、 $\chi^2=0.48, 0.62, 0.26, 0.05, 0.17$, 全て $p > 0.05$)。すなわち本研究においてタイピングエラーはなく、遺伝子型およびアレル頻度による解析を行うことが妥当であることが示唆された。

2. 広汎性侵襲性歯周炎と TNF レセプター遺伝子多型の関連性について

1) 有意性の検定

表2に示すように、広汎性侵襲性歯周炎患者群と健常者群で TNF レセプター遺伝子型の頻度分布を比較したところ、TNFR 1 (-383) の頻度分布において C/C 型はいずれの群にも認められないものの、A/C 型が健常者群で13.0% に対して患者群で2.2% であり、統計学的有意差が認められた ($p=0.033$, フィッシャーの直接確率法)。一方、TNFR 1 (+36), TNFR 2 (+587), (+694), (VNTR) においてカイ2乗検定を行ったところ、2群間の遺伝子型頻度分布に有意差は認められなかった。

同様に、TNF レセプター遺伝子多型のアレル頻度について比較検討したところ (表3), 患者群で TNFR 1 (-383) C アレル頻度が有意に低いことが認められた ($p=0.037$, フィッシャーの直接確率法) が、他の4カ所においては統計学的有意差は認められなかった。

2) 同等性の検定

有意性の検定結果が“有意でない”ことは、必ずしも差がないことを積極的に意味するものではないと考えられる。このような問題点を統計学的に解決する方法として、同等性の Δ 検定があげられる。そこで、TNF レセプター遺伝子多型の頻度が患者群と健常者群において等しいことを積極的に証明するため、アレル頻度において許容範囲0.1 (10%) として同等性の検定を行ったところ (表3), TNFR 2 (+587), (+694), (VNTR) の3カ所に同等性が認められた ($p < 0.01$)。

3) 交絡因子の補正

多因子疾患におけるケースコントロール関連分析で交絡因子を考慮・補正して解析することは有用とされる。本研究では有意性の検定および同等性の検定において、歯周炎における交絡因子のひとつと考えられる性別を Mantel-Haenszel 法によって補正したところ (表3), 補正後も TNFR 1 (-383) C アレル頻度が患者群で有意に低い ($p=0.04$) こと、また TNFR 2 (+587) および (VNTR) のアレル頻度は患者群と健常者群で同等である ($p < 0.01$) ことが示された。

表 2 広汎性侵襲性歯周炎 (G-AgP) 患者および健常者における各 TNF レセプター遺伝子型の分布

遺伝子多型	G-AgP 患者		健常者		p 値
	(%)	n=45	(%)	n=100	
TNFR 1 -383	AA	97.8	44	87.0	0.033*
	AC	2.2	1	13.0	
	CC	0.0	0	0.0	
+36	AA	62.2	28	70.0	NS**
	AG	33.3	15	26.0	
	GG	4.4	2	4.0	
TNFR 2 +587	TT	77.8	35	83.0	NS
	TG	22.2	10	16.0	
	GG	0.0	0	1.0	
+694	GG	86.7	39	92.0	NS
	GA	13.3	6	8.0	
	AA	0.0	0	0.0	
VNTR	1/1	4.4	2	3.0	NS
	1/2	28.9	13	33.0	
	2/2	66.7	30	64.0	

*TNFR 1 (-383) の解析は、フィッシャーの直接確率法による検定

**NS: p>0.05

表 3 広汎性侵襲性歯周炎 (G-AgP) 患者、健常者における各 TNF レセプター遺伝子のアレル頻度ならびに統計学的解析結果

遺伝子多型	G-AgP 患者		健常者		p 値				
	(%)	n=45	(%)	n=100	有意性の検定	同等性の検定	補正後の有意性検定	補正後の同等性検定	
TNFR 1 -383	A	98.9	89	93.5	187	0.037*	NS**	0.04	NS
	C	1.1	1	6.5	13				
+36	A	78.9	71	83.0	166	NS	NS	NS	NS
	G	21.1	19	17.0	34				
TNFR 2 +587	T	88.9	80	91.0	182	NS	p<0.01	NS	p<0.01
	G	11.1	10	9.0	18				
+694	G	93.3	84	96.0	192	NS	p<0.01	NS	NS
	A	6.7	6	4.0	8				
VNTR	1	18.9	17	19.5	39	NS	p<0.01	NS	p<0.01
	2	81.1	73	80.5	161				

総アレル数: G-AgP 患者 2n=90, 健常者 2n=200

*TNFR 1 (-383) の解析は、フィッシャーの直接確率法による検定

**NS: p>0.05

考 察

我々は本研究において、広汎性侵襲性歯周炎患者と日本人健常者の TNFR 1 並びに TNFR 2 遺伝子の 5 カ所の遺伝子多型について、その頻度を調べ、比較検

討した。

今回の 5 カ所の遺伝子多型について、日本人健常者における頻度を、TNFR 1 (-383) A/C は 10.7% ~ 11.0%, C/C は 0%^{31,39)}, TNFR 2 (+587) T/G は 17.9% ~ 30.6%, G/G は 0.9 ~ 3.6%^{21,22,34)}, TNFR 2 (+694) G/A は 8.0%, A/A は 0%²⁸⁾ とす

る他の報告があり、我々の報告もほぼ同じ頻度を示していた。日本人における TNFR 1 (+36), TNFR 2 (VNTR) の遺伝子型頻度はこれまで報告されていない。他の人種においては、白人 (コーカシアン) の健常者で TNFR 1 (-383) A/C 1.0%, C/C が 0%^{26,40)}, TNFR 1 (+36) A/G 53.1~55.0%, G/G 16.1~25.0%^{27,33,41)}, TNFR 2 (+587) T/G は 29.0%~40.9%, G/G が 3.0~5.1%^{33,42)}, TNFR 2 (VNTR) 1/2 42.4%, 2/2 48.5%²⁹⁾ と報告されており、いずれの遺伝子型についても健常者において白人と日本人の頻度は著しく異なることが分かる。遺伝子多型の頻度を患者群と健常者群で比較するケースコントロール関連解析は疾患感受性遺伝子の探索法の一つであるが、この解析においては同じ遺伝子多型の頻度を持つ患者群であっても健常者群での遺伝子多型の頻度が異なると、結果として疾患との関連性も異なってくる。したがって、遺伝子多型の頻度が異なる人種での結果を他の人種に適用することは難しく、日本人における遺伝子多型の頻度を検索することの重要性が示唆される。

近年、サイトカイン遺伝子多型と歯周疾患との関連性が注目されている。慢性 (成人性) 歯周炎においては、その重症度と IL-1 α -889 (+4845) ならびに IL-1 β +3953 (+3954) 遺伝子多型の関連性をはじめとする報告が多くなされている⁶⁾。侵襲性 (早期発症型) 歯周炎においては、白人⁴³⁾、アフリカ系アメリカ黒人⁴⁴⁾における IL-1 遺伝子多型、白人における IL-4⁴⁵⁾、-10²³⁾ 遺伝子多型との関連性が報告されている。TNF- α 遺伝子多型に関しては、白人における侵襲性 (早期発症型) 歯周炎および慢性 (成人性) 歯周炎の重症度についての解析が行われているが^{23,46,47)}、有意な関連性は見出されていない。これまで我々のグループは日本人において IL-1 α (+4845), IL-1 β (-511), IL-1 β (+3954), IL-1 レセプターアンタゴニスト (VNTR)¹⁵⁾, IL-10 (-1082, -819, -592)¹⁷⁾, TNF- α (-1031, -863, -857, -308, -238)¹⁶⁾ 遺伝子多型と広汎性侵襲性 (早期発症型) 歯周炎との関連性について検討を行ってきた。Tai et al.¹⁵⁾ は IL-1 レセプターアンタゴニスト遺伝子の VNTR 多型保有者は、非保有者に比べ広汎性侵襲性 (早期発症型) 歯周炎に 3.8 倍なりやすいことを報告した。一方、Endo et al.¹⁶⁾ は TNF- α プロモーター領域遺伝子多型の解析を行った結果、-857 部位の多型を有するハプロタイプの頻度が、広汎性侵襲性 (早期発症型) 歯周炎患者群で低い傾向にあるものの、統計学的有意差は見出せなかった。

そこで今回我々は、歯周炎の病態形成に関わる

TNF- α シグナル伝達経路⁴⁸⁾のなかで、そのレセプターである TNFR 1, TNFR 2 の遺伝子多型に着目し、広汎性侵襲性歯周炎患者群と健常者群における遺伝子型、アレル頻度の比較検討を行ったところ、TNFR 1 (-383) C 多型アレル保有者の頻度が患者群で有意に低く、性別で補正後も有意性が変わらないことを明らかにした ($p=0.034, 0.04$)。しかしながら他の 4 か所には両群間に統計学的な有意差は見出せなかった。

近年、TNFR 1 (-383) A/C 遺伝子多型は、日本人 1 型糖尿病患者において、TNFR 1 (-383) C アレル保有者の頻度が患者群で有意に高い (患者群 24.8% vs. 健常者群 11.0%) ことが報告された。さらにこの遺伝子多型に関する機能解析として、野生型の TNFR 1 (-383) A アレルと多型の TNFR 1 (-383) C アレルをそれぞれ導入した HeLa 細胞で、細胞を未刺激の状態での TNFR 1 遺伝子の転写活性の指標となるルシフェラーゼ活性を測定したところ、多型の TNFR 1 (-383) C アレルを導入された HeLa 細胞は、転写活性が野生型の TNFR 1 (-383) A アレルに比べて 1.7 倍高いことが報告された³¹⁾。このことから、多型の TNFR 1 (-383) C アレルを保有する歯周炎患者の歯周組織では、こうした TNFR 1 遺伝子転写の亢進がより多くの膜型 TNFR 1 発現を促し、このレセプターを介して過剰な TNF- α シグナルが伝達され、過剰な免疫応答を誘導した結果、破壊的に作用する可能性が推察される。しかしながら、これは広汎性侵襲性歯周炎患者群で多型の TNFR 1 (-383) C アレル頻度が有意に低いという今回の結果とは矛盾している。その理由として、歯周炎において膜型 TNFR 1 以外にも TNF- α シグナル伝達経路に関わる TNFR 2 やそれらの可溶性分子との関連性が十分に解明されていないこと、また転写活性の測定系は細胞依存性であり、使用する細胞株によって異なる結果が生じる可能性があることが考えられ、この多型の機能的意義と歯周炎の病態を現段階で考察することは難しい。今後更なる機能的解析が必要とされる。むしろ、この多型を遺伝子マーカーとして捉え、連鎖不平衡解析によって、より機能的意義のある遺伝子多型を検索したり、疾患感受性遺伝子を検索するために利用した方が有用かもしれない。実際に、近年 TNFR 1 (-383) アレルと連鎖不平衡にあるプロモーター領域の新たな遺伝子多型が報告されている⁴⁰⁾。今後、このような多型も含めて検討することで、歯周炎感受性遺伝子の発見に近づけるかもしれない。

歯周炎を含む多因子疾患の感受性遺伝子を同定するためのケースコントロール関連解析は、家系での連鎖

をもとに遺伝子解析を行うノンパラメトリック解析とは異なり、親子や兄弟のサンプルが必要ではなくサンプル収集が比較的容易であるものの、問題点の一つとして、相当数のサンプルが必要な点があげられる。サンプル数が小さいと、患者群と健常者群でアレル頻度に差がないという帰無仮説が偽であるにも関わらずこの帰無仮説を棄却できない偽陰性 (false negative) が起きる、いわゆる第2種の過誤が起きる可能性がある⁴⁹⁾。すなわちサンプル数が小さいと、本来は疾患と関連があるはずの遺伝子多型について、統計学的にその関連性を証明できない危険性があるということである。

しかし、侵襲性歯周炎はその発症頻度が低いため、サンプルの確保が現実的にはきわめて困難である。今回我々は、こうした問題を解決する手段について検討を行った。有意性検定によって両群の遺伝子型頻度に差が見られなかった4カ所の遺伝子多型について同等性の検定を行い、積極的に両群の遺伝子多型の頻度が同等であることを統計学的に証明することを試みたところ、TNFR 2 (+587), (+694), (VNTR) の3カ所の遺伝子多型において同等性が認められた ($p < 0.01$)。さらに歯周炎の交絡因子のひとつと考えられる性別について Mantel-Haenszel 検定によって調整したところ、TNFR 2 (+587), (VNTR) の2カ所の遺伝子多型において同等性が認められた ($p < 0.01$)。このことはこれら2カ所の遺伝子多型においては、たとえ患者群のサンプル数を増やして有意性の検定を行っても統計学的有意差を導くことは困難であることを示唆している。無論、日本人の侵襲性歯周炎患者サンプルをより多くの施設が提供しあって解析を進めることは肝要であるが、今後数多くの遺伝子多型解析が行われていく中で、このような同等性の検定を併用することにより、第2種の過誤を可及的に避けることができ、より正確で効率的な疾患感受性遺伝子多型のスクリーニングを行うことが可能になると考えられる。

1999年にアメリカ歯周病学会から歯周炎の新分類が報告された。侵襲性歯周炎と慢性歯周炎の診断基準は、より臨床的で診断が容易になったといえる。しかしながら、新分類は歯周炎の特徴である多様化した病因に基づいた分類ではないことから、この診断のみを用いてより効果的な治療法を選択することは困難である。岡田は⁵⁰⁾、現行の臨床的診断は破壊の結果の程度によるもので、活動性の診査に基づいたものではないため、歯周炎の病因を明らかにしてこれを歯周炎の診査・診断に利用すべきだと述べており、その一助として歯周組織における炎症性サイトカインの mRNA

の発現をレーダーチャートにし、患者群をクラスター化する方法を報告している⁵¹⁾。一方、Takahashi et al.⁵²⁾は、侵襲性 (早期発症型) 歯周炎患者における好中球の機能、リンパ球の形質・機能解析、サイトカイン産生能、HLA 遺伝子型などの多岐にわたる免疫学的検索の結果、侵襲性歯周炎の病態が単一ではなく、非常に多様性に富んでいることを報告している。今回我々が検索した患者群についてもそうした多様性は否定できない。これまで蓄積された免疫学的データに遺伝子多型を組み合わせることで、このような多様性に富んだ侵襲性歯周炎をクラスター化し病態を分類することが今後可能となれば、遺伝子多型の解析が歯周炎の診査・診断に貢献することができると考えられる。

以上のことより本研究において、広汎性侵襲性歯周炎の発症に TNFR 1 (-383) 遺伝子多型が関連する一方で、TNFR 2 (+587), (VNTR) 遺伝子多型は関連性が乏しい可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部附属病院医療情報部 赤澤宏平教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたりご協力いただきました本学歯周診断・再建学分野の医局員の先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 12-13 年度科学研究費補助金奨励研究 (A) 課題番号 12771322, 13470461 の補助を受けて行った。

本論文の要旨は、第 80 回 International Association for Dental Research (IADR) General Session (2002 年 3 月 7 日)、第 45 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2002 年 10 月 26 日) において発表した。

参考文献

- 1) 高柴正悟：歯周病の遺伝的素因、岡田 宏、石川 烈、村山洋二、歯周病 新しい治療を求めて、先端医療技術研究所、東京、2000、268-276。
- 2) Armitage GC : Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4 : 1-6, 1999.
- 3) Ranney RR : Differential diagnosis in clinical trials of therapy for periodontitis. *J Periodontol*, 63 : 1052-1057, 1992.
- 4) Hart TC, Kornman KS : Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000, 14 : 202-215, 1997.
- 5) Hart TC : Genetic risk factors for early-onset

- periodontitis. *J Periodontol*, 67 : 355-366, 1996.
- 6) 小林哲夫, 吉江弘正 : 歯周病の疾患感受性遺伝子. *医学のあゆみ*, 202 : 883-887, 2002.
 - 7) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS : Advances in the pathogenesis of periodontitis : summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000, 14 : 216-248, 1997.
 - 8) Wilton JMA, Bampton JLM, Griffiths GS, Curtis MA, Life JS, Johnson NW, Powell JR, Harrap GJ, Critchley P : Interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 19 : 53-57, 1992.
 - 9) Aderka D : The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7 : 231-240, 1996.
 - 10) Tervahartiala T, Koski H, Xu J-W, Häyrynen-Immonen R, Hietanen J, Sorsa T, Konttinen YT : Tumor necrosis factor- α and its receptors, p 55 and p 75, in gingiva of adult periodontitis. *J Dent Res*, 80 : 1535-1539, 2001.
 - 11) Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT : IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*, 160 : 403-409, 1998.
 - 12) Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D : Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 69 : 1419-1425, 1998.
 - 13) Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT : Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28 : 233-240, 2001.
 - 14) Ohe H, Takashiba S, Naruishi K, Chou H-H, Yamada H, Nishimura F, Arai H, Murayama Y : Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced and interleukin-1 β (IL-1 β)-induced shedding of TNF receptors from gingival fibroblasts. *J interferon cytokine res*, 20 : 1077-1082, 2000.
 - 15) Tai H, Endo M, Shimada Y, Gou E, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H : Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*, 29 : 882-888, 2002.
 - 16) Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H : Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor- α gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 72 : 1554-1559, 2001.
 - 17) Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, Yoshie H : Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28 : 828-832, 2001.
 - 18) Greenwald RA, Kirkwood K : Adult periodontitis as a model for rheumatoid arthritis (with emphasis on treatment strategies). *J Rheumatol*, 26 : 1650-1653, 1999.
 - 19) 宮坂信之 : Etanercept 夢のリウマチ治療薬となるか? *Molecular Medicine*, 39 : 212-216, 2002.
 - 20) 土屋尚之 : 全身性エリテマトーデス, 関節リウマチ疾患感受性遺伝子研究の現状. *医学のあゆみ*, 202 : 815-820, 2002.
 - 21) Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Tokunaga K : Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR 2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 53 : 527-533, 1999.
 - 22) Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Shiota M, Ohashi J, Wakui M, Matsuta K, Tokunaga K : Tumor necrosis factor α 5'-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB 1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43 : 753-757, 2000.
 - 23) Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G : Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodont Res*, 34 : 379-386, 1999.
 - 24) Fuchs P, Strehl S, Dworzak M, Himmeler A, Ambros PF, Structure of the human TNF receptor 1 (p 60) gene (TNFR 1) and localization to chromosome 12 p 13. *Genomics*, 13 : 219-224, 1992.
 - 25) Santee SM and Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p 75/80 (CD 120 b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem*, 271 (35) : 21151-21159, 1996.
 - 26) Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL : Identification of a rare *Bgl* II polymorphism in the promoter region of the human TNF receptor type I (p 55) gene. *Eur J Immunogenet*, 25 : 271-272, 1998.
 - 27) Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL : An *Msp*A I I polymorphism in exon

- 1 of the human TNF receptor type I (p 55) gene. *Eur J Immunogenet*, 25 : 269-270, 1998.
- 28) Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Ohashi J, Tokunaga K : New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR2 : association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, 1 : 501-503, 2000.
- 29) Keen L, Wood N, Olomolaiye O, Bidwell J : A bi-allelic VNTR in the human TNFR2 (p 75) gene promoter. *Genes Immun*, 1 : 164-165, 1999.
- 30) Kemper O, Wallach D : Cloning and partial characterization of the promoter for the human p 55 tumor necrosis factor (TNF) receptor. *Gene*, 234 : 209-216, 1993
- 31) Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, Hara H, Adachi T, Ohta M, Tegoshi H, Fukui M, Hasegawa G, Shigeta H., Kitagawa Y, Nakano K, Kaji R, Nakamura N : TNF, TNF receptor type I, and Allograft inflammatory factor -1 gene polymorphisms in Japanese patients with type I Diabetes. *Human Immunology*, 64 : 302-309, 2003.
- 32) Kruger R, Hardt C, Tschentscher F, Jackel S, Kuhn W, Muller T, Werner J, Woitalla D, Berg D, Kuhn N, Fuchs GA, Santos EJM, Przuntek H, Eppel JT, Schols L, Riess O. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107 : 553-562, 2000.
- 33) Barton A, John S, Ollier WER, Silman A, Worthington J : Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum*, 44 : 61-65, 2001.
- 34) Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K, Niho Y : Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196 R with systemic lupus erythematosus in the Japanese. *Arthritis Rheum*, 44, 2819-2827, 2001.
- 35) Fabris M, Tulusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L Ferraccioli, G : Tumor necrosis factor- α receptor II polymorphism in patient from Southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 29 : 1847-1850, 2002.
- 36) Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG : The biallelic variable number of tandem repeats of the tumor necrosis factor receptor 2 promoter in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 23 : 108-111, 2003.
- 37) Diehl SR, Wang YF, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, Schenkein HA : Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 70 : 418-430, 1999.
- 38) 丹後俊郎 : 新版 医学への統計学, 第6刷, 朝倉書店, 東京, 259-270, 1993.
- 39) Nishimura M, Maeda M, Matsuoka M, Mine H, Saji H, Matsui M, Kuroda Y, Kawakami H, Uchiyama T : Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin - α , and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Human Immunology*, 61 : 1262-1269, 2000.
- 40) Bridges Jr. SL, Jenq G, Moran M, Kuffner T, Whitworth WC, & McNicholl J. Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes. *Arthritis Rheum*, 46 : 2045-2050, 2002.
- 41) Bazzoni F, Gatto L, Lenzi L, Vinante F, Pizzolo G, Zanolin E, Gironcoli MD : Identification of novel polymorphisms in the human *TNFR1* gene : distribution in acute leukemia patients and healthy individuals. *Immunogenetics*, 51 : 159-163, 2000.
- 42) Al-Ansari AS, Ollier WER, Villarreal J, Ordi J, Teh LS, Hajeer AH : Tumor necrosis factor receptor II (TNFR2) exon 6 polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 55 : 97-99, 2000.
- 43) Parkhill JM, Henning BJW, Chapple ILC, Heasman PA, Taylor JJ : Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27 : 682-689, 2000.
- 44) Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC : Genetic polymorphisms of the IL-1 α and IL-1 β genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol*, 71 : 723-728, 2000.
- 45) Michel J, González JR, Wunderlich D, Diете A, Herrmann JM, Meyle J : Interleukin-4 polymorphism in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28 : 483-488, 2001.
- 46) Galbraith GMP, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP : Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 26 : 705-709, 1999.
- 47) Galbraith GMP, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP : Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes : Influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol*, 69 : 428-433, 1998.

- 48) 高柴正悟：歯周病のオーダーメイド治療に向けた単球機能の分子生物学的研究. 日歯周誌, 44 : 254-260, 2002.
- 49) 井ノ上逸朗：遺伝子多型を利用した疾患遺伝子検索法. 中村祐輔, SNP 遺伝子多型の戦略, 中山書店, 東京, 2000, 62-69.
- 50) 岡田 宏：歯周病の診断を思う. 日歯周誌, 44 : 241-253, 2002.
- 51) 村上伸也, 野崎剛徳：細胞間相互作用から見た病態診断, 吉江弘正, 宮田 隆, 歯周病診断のストラテジー, 医歯薬出版, 東京, 1999, 158-167.
- 52) Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y : Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol, 72 : 425-437, 2001.

連絡先：

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野
〒951-8514 新潟市学校町通2番町5274